

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 202**

21 Número de solicitud: 201530349

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/41** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**18.03.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**19.09.2016**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)  
Patio de Escuelas, 1  
37008 Salamanca ES**

72 Inventor/es:

**CELADOR LERA, Lorena;  
FLORES FÉLIX, José David;  
MATEOS GONZÁLEZ, Pedro Francisco;  
MARTÍNEZ MOLINA, Eustoquio;  
VELÁZQUEZ PÉREZ, Encarna y  
RIVAS GONZÁLEZ, Raúl**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Cepa de Rhizobium leucaenae y su uso como biofertilizante**

57 Resumen:

Cepa de Rhizobium leucaenae y su uso como biofertilizante.

La presente invención se refiere a una cepa de Rhizobium que, cuando se administra a una planta, tiene la capacidad de interactuar con ella y promover su crecimiento, consiguiendo incrementar tanto el desarrollo foliar como radicular de la misma. Por lo tanto, la invención describe una cepa de Rhizobium leucaenae depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT 8306 con capacidad para incrementar o promover el crecimiento de las plantas, la composición que la comprende y su uso como biofertilizante para incrementar o promover el crecimiento de las plantas.

ES 2 583 202 A1

**Cepa de *Rhizobium leucaenae* y su uso como biofertilizante**

**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a una cepa de *Rhizobium leucaenae* CECT8306 que, cuando se administra a una planta, tiene la capacidad de interactuar con ella y promover su crecimiento, consiguiendo incrementar tanto el desarrollo foliar como radicular de la misma. Por lo tanto, la cepa descrita en la presente invención tiene su aplicación en el campo de la agricultura como biofertilizante.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Uno de los principales objetivos de la agricultura actual es la reducción del uso de fertilizantes químicos, debido tanto al creciente gasto que implican como a la reducción de impactos ambientales minimizando la emisión de gases de efecto invernadero derivados de su uso y evitando la contaminación de ecosistemas. Sin embargo, la metodología utilizada por la agricultura convencional para hacer frente a este reto sólo es capaz de afrontarlo mediante la aplicación de técnicas que o bien implican una reducción de la producción o un incremento de los costes. Por esta razón, el uso de biofertilizantes es una alternativa eficiente, barata y sostenible capaz de hacer frente a este objetivo además de hacer eficiente el aprovechamiento de los recursos naturales del suelo. El grupo de bacterias denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR exhiben una serie de mecanismos que influyen sobre el balance de nutrientes disponibles para la planta, además de incrementar su resistencia a distintos tipos de estrés y como elicitores de resistencia a patógenos, entre otras. Entre estos mecanismos encontramos la fijación biológica de nitrógeno, tanto en simbiosis como en vida libre, la solubilización de fosfato bien mediante la producción de ácidos o la producción de enzimas específicas como las fitasas y fosfatasas, la producción de sideróforos que incrementan el hierro disponible para la planta y la producción de fitohormonas.

15

20

25

30

La interacción planta-microorganismo se vuelve más directa y eficiente cuando las bacterias que muestran los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal son capaces de colonizar el interior de la planta, ocupando los espacios intercelulares de raíz, tallo y hojas, comportándose como un organismo endófito, estableciendo una relación estrecha con la planta sin hacerle daño ni desencadenar los mecanismos de

35

defensa de la misma. Al mismo tiempo, un requisito necesario para la formulación de biofertilizantes es la utilización de bacterias inocuas para el ser humano, puesto que algunas bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* o *Burkholderia cepacia* presentan cualidades para promover el crecimiento vegetal pero desencadenan otra serie de problemáticas en la salud. Asociados a las especies del género *Rhizobium* se han descrito mecanismos de promoción del crecimiento vegetal como la solubilización de fosfato, la producción de sideróforos y la producción de diversas fitohormonas como el ácido indol acético, citoquininas y giberelinas (Mehbood, I. *et al.*, 2009. *Critical Reviews in Plant Science*, 28: 432-456) haciendo estas especies idóneas para la utilización como movilizadoras, productoras o facilitadoras de la absorción de nutrientes para la planta. Además, se ha demostrado que la característica simbiótica no está dada solo entre *Rhizobium*-Leguminosa, donde forma nódulos fijadores de nitrógeno, si no entre plantas no leguminosas, ya que se han descrito complejas y específicas maquinarias moleculares que le permiten interactuar con plantas de diferentes géneros, colonizando e ingresando en el interior de plantas como arroz y lechuga, promoviendo el crecimiento vegetal e incluso incrementando el rendimiento de la producción.

Es conocido que plantas y animales normalmente se asocian con diversos microorganismos. En el intestino, las bacterias tienen un papel destacado para estimular la inmunidad y el desarrollo. Del mismo modo que las bacterias de las plantas estimulan las respuestas de defensa de estas, las bacterias de las raíces y de la rizosfera se benefician de los exudados de las raíces. Además, algunas bacterias y hongos son capaces de entrar en la planta como endófitos sin causar daños y pueden establecer asociaciones mutualistas. Las plantas constituyen grandes nichos de diversos organismos endófitos. Las bacterias endófitas han sido aisladas de una gran diversidad de plantas. Tanto las poblaciones de bacterias endófitas como las rizosféricas están condicionadas por los factores bióticos y abióticos, pero las bacterias endófitas podrían estar mejor protegidas del estrés biótico y abiótico que las bacterias rizosféricas. Este hecho sería debido a que el interior de la planta es un ambiente mucho más estable y homogéneo en el tiempo, independiente de las fluctuaciones de humedad, salinidad o pH que pueden acaecer en la rizosfera.

La solicitud de patente española ES2402039 describe una cepa del género *Rhizobium*, en concreto la cepa *Rhizobium leguminosarum* CECT7758, la cual presenta la capacidad de promover el crecimiento en plantas no leguminosas.

Debido a esta razón, el uso de bacterias del género *Rhizobium* se presenta como una herramienta básica e interesante para el desarrollo y utilización de futuros biofertilizantes, puesto que su uso no representa peligro alguno para la salud humana ya que dentro de este género no se han descrito especies patógenas de humanos y sin embargo, sí presenta connotaciones positivas en la agricultura y la economía. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar fertilizantes alternativos a los existentes en el estado de la técnica que no representen una amenaza ni para el medio ambiente ni para la salud humana.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han aislado una cepa de *Rhizobium*, en particular *Rhizobium leucaenae* que, sorprendentemente, tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas (tanto folicular como radial) y mejorar con ello el rendimiento de los cultivos. La cepa aislada por los inventores es la cepa de *Rhizobium leucaenae* CECT8306. Los inventores aislaron dicha cepa a partir de la raíz de *Zea mays* y mediante diversos ensayos (ver Ejemplo 1), comprobaron que el crecimiento vegetal de las plantas se ve incrementado cuando éstas crecen en presencia de *Rhizobium leucaenae* CECT8306 en comparación con plantas control (ver Figuras 5 a 10).

En base a esta nueva cepa, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

### Cepa y composición de la invención

Tal como se ha descrito al comienzo de la presente descripción, los autores han aislado una cepa de *Rhizobium leucaenae* que tiene la capacidad de promover y/o incrementar el crecimiento vegetal de las plantas.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con una cepa de *Rhizobium leucaenae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT 8306, de aquí en adelante "cepa de la invención".

La cepa de la invención fue aislada a partir de *Zea mays* tal como se describe en el Ejemplo 1 y depositada el 19 de junio de 2013 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 5 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT 8306. El depositante fue D. Raúl Rivas González, con dirección Departamento de Microbiología y genética, Lab 210, Edificio Departamental de Biología, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca. La clasificación científica de la cepa CECT 8306 de la presente invención es: Reino: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: alfa-10 Proteobacteria, Orden: *Rhizobiales*, Familia: *Rhizobiaceae*, Género: *Rhizobium*, Especie: *Rhizobium leucaenae*.

El análisis y estudio de la cepa de la invención demostró que ésta era capaz de producir sideróforos, solubilizar fosfatos en forma de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , producir ácido indolacético o AIA (auxina que promueve el crecimiento de los tejidos meristemáticos de las plantas), colonizar la raíz de las plantas e interactuar con ellas, producir celulosa y de formar biopelículas. Además, se observó que la cepa posee un inserto en el gen 15 16S de aproximadamente 70 pares de bases que está ausente en el resto de especies del género *Rhizobium*. Por otro lado, semillas inoculadas con la cepa de la invención dieron lugar a plantas que mostraron un mayor crecimiento de la parte aérea y un mayor grosor y pilosidad de la raíz en comparación con plantas obtenidas a partir de semillas no inoculadas con la cepa de la invención. Por lo tanto, la cepa de la invención es capaz de promover o incrementar el crecimiento de las plantas.

25 Dentro de la presente invención, también están contemplados aquellos microorganismos o bacterias que derivan de la cepa de la invención y que conservan la capacidad de incrementar o promover el crecimiento de las plantas. Ejemplos de cepas o microorganismos derivados de la cepa de invención pueden ser mutantes que presentan variaciones en su genoma respecto al genoma de la cepa de la invención pero que no afectan a la capacidad de la cepa de incrementar o promover el crecimiento de las plantas. Así, cepas mutantes derivadas de la cepa de la invención que conservan la capacidad de incrementar o promover el crecimiento de las plantas también están contempladas dentro de la presente invención. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención también se refiere a una cepa derivada de la cepa de la 30 invención con capacidad para incrementar o promover el crecimiento de las plantas. 35

La cepa derivada de la cepa de la invención puede producirse de forma natural, o bien de forma intencionada por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, sin limitarse a, el crecimiento de la cepa original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés, o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación de genes específicos. Así, dentro de la presente invención también se contemplan mutantes genéticamente modificados derivados de la cepa de la invención que conservan su capacidad de incrementar o mejorar el crecimiento de las plantas.

Por otro lado, dentro de la presente invención, también se contemplan los componentes celulares, metabolitos y moléculas secretadas por la cepa de la invención o por la cepa derivada de la cepa de la invención, así como las composiciones que comprenden dichos componentes y los usos de los mismos para incrementar o promover el crecimiento de las plantas. Entre los componentes celulares de la bacteria se podrían incluir los componentes de la pared celular (como por ejemplo pero sin limitarse, peptidoglicano), los ácidos nucleicos, los componentes de la membrana, u otros como proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones, como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas. Los metabolitos incluyen cualquier molécula producida o modificada por la bacteria como consecuencia de su actividad metabólica durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos o durante el almacenamiento del producto. Ejemplos de estos metabolitos son, pero sin limitarse, los ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos. Las moléculas secretadas incluyen cualquier molécula exportada o liberada al exterior por la bacteria durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo de elaboración de alimentos o fármacos) o el almacenamiento del producto. Ejemplos de estas moléculas incluyen, pero sin limitarse, ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos.

En la presente invención se entiende que una cepa (o compuesto derivado de ella) tiene la capacidad de “incrementar” o “promover” el crecimiento vegetal cuando dicha cepa es capaz de aumentar la cantidad de biomasa producida por una planta en unidad de tiempo. Así, en igualdad de tiempo y condiciones, la biomasa producida por una planta que comprende la cepa de la invención será mayor que la biomasa

producida por una planta de la misma especie que no comprende la cepa de la invención (o que no ha sido puesta en contacto con la cepa o la composición de la invención).

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un cultivo biológicamente puro de la cepa de la invención. En la presente invención, se entiende que un cultivo es biológicamente puro cuando al menos el 95% de los microorganismos presentes en el cultivo corresponden a la cepa de la invención.

10 La cepa de la invención puede crecer en cualquier medio de cultivo que sea adecuado para *Rhizobia*. Ejemplos de medio de cultivos adecuados para el cultivo de la cepa de la invención incluyen, sin limitarse a, medio YMA y TY. No obstante, el medio de cultivo preferido es medio YMA. En la presente invención se entiende por “medio YMA” o “medio de cultivo MYA” a aquel medio compuesto por  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  
15  $NaCl$ , extracto de levadura y agar, preferiblemente, en las siguientes concentraciones:  $K_2HPO_4$  a una concentración de aproximadamente 0,2 g/L,  $MgSO_4$  a una concentración de aproximadamente 0,2 g/L,  $NaCl$  a una concentración de aproximadamente 0,1 g/L, extracto de levadura a una concentración de aproximadamente 2 g/L, y agar a una concentración de aproximadamente 20 g/L. La  
20 composición del medio TY comprende extracto de levadura desde 0,2 a 0,4 %, triptona desde 0,3 a 9,5% y agar desde 1,5 a 2%.

Como entiende el experto en la materia, la cepa de la invención o la cepa derivada de ella o los componentes derivados de ella pueden estar formando parte de una  
25 composición. Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende la cepa de la invención, la cepa derivada de ella y/o los componentes derivados de ella.

La composición, definida de forma general, es un conjunto de componentes que está  
30 formado al menos por la cepa de la invención en cualquier concentración. Cabe destacar con respecto a las cepas empleadas en la presente invención, que resulta interesante que dichas cepas se encuentran en fase exponencial de crecimiento, ya que de esta forma se encuentran en una mejor disposición metabólica para su desarrollo y promover los efectos beneficiosos dentro de las plantas. No obstante, en  
35 una realización particular, la concentración de la cepa de la invención en medio líquido es de  $1 \times 10^8$  UFC/mL y  $3,8 \times 10^8$  UFC/mL, en particular, entre  $1,8 \times 10^8$  UFC/mL y

3,6x10<sup>8</sup> UFC/mL, más particular, entre 2x10<sup>8</sup> UFC/mL y 3x10<sup>8</sup> UFC/mL, aún más particular, 2,5x10<sup>8</sup>UFC/mL. En vehículos o medios sólidos la concentración de la cepa de la invención es de entre 1,8x10<sup>8</sup> UFC/g y 3,6x10<sup>11</sup> UFC/g.

5 Acompañando a la cepa de la invención, la composición puede comprender otros organismos que pueden resultar beneficiosos para las plantas, tales como bacterias (incluyendo actinomicetos), hongos, algas y protozoos. Ejemplos de dichos microorganismos incluyen, sin limitar a, hongos del género *Trichoderma* (tales como *T. harzianum* Rifai, *T. viride* Pers., *T. polysporum* Link fr, *T. reesei* EG Simmons, *T.*  
 10 *virens*, *T. longibrachatum* Rifai, *T. parceromosum* , *T. pseudokoningii* , *T. hamatum* , *T. lignorum*, *T. citroviride*, etc.), micorrizas (*Glomus* sp., etc.), bacterias del género *Rhizobium* (tales como *R. cellulosilyticum*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. hainanense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, , *R. lusitanum*, , *R. mongolense*, *R. phaseoli*, *R. rhizogenes*, *R. sullae*, *R. tropici*, *R. yanglingense*, etc.),  
 15 del género *Neorhizobium* (*N. galegae*, *N. huautlense*, etc.), *Allorhizobium* (*A. undicola*), *Pararhizobium* (*P. giardinii*), *Mesorhizobium* (*M. loti*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum*, *M. huakuii*, *M. tianshanense*, etc.), *Ensifer* (*E. fredii*, *E. meliloti*, etc.), *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*, *B. lupini*, etc.), bacterias que colonizan tejidos vegetales internos (tales como *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Gluconacetobacter*  
 20 *diazotrophicus*, *Paenibacillus* sp, etc.), algas marinas (tales como *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Laminaria* sp., etc.), etc. Por lo tanto, en otra realización particular, la composición de la invención comprende una bacteria del género *Rhizobium* diferente de la cepa de la invención, preferiblemente dicha bacteria del género *Rhizobium* es *Rhizobium leguminosarum* CECT 7759 o *Rhizobium*  
 25 *leguminosarum* CECT 7758.

Adicionalmente, la composición de la invención puede comprender compuestos que participen en el desarrollo vegetal, tales como las fitohormonas. Las fitohormonas son sustancias producidas por las células vegetales que intervienen en multitud de  
 30 procesos biológicos y que son capaces de regular los fenómenos fisiológicos de las plantas. Ejemplos de fitohormonas que puede emplearse en la composición de la invención incluyen, sin limitar a, auxinas, giberelinas, citocininas y etileno.

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que funcionan como reguladoras del  
 35 crecimiento vegetal (esencialmente provocan la elongación de las células) y pueden ser naturales (sintetizadas por una célula vegetal de manera silvestre) o artificiales

(sintetizadas en el laboratorio). Ejemplos de auxinas naturales incluyen, sin limitar a, ácido indol-3-acético (AIA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA) y ácido fenilacético. Ejemplos de auxinas artificiales incluyen, sin limitar a, ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA).

5

La giberelina es una fitohormona producida en la zona apical, frutos y semillas, cuyas principales funciones son la interrupción del período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar, la inducción del desarrollo de yemas y frutos y la regulación del crecimiento longitudinal del tallo. Ejemplos de giberelinas incluyen, sin limitar a, el ácido giberélico (GA3), giberelina A1 (GA1) y giberelina A4 (GA4).

10

Las citocininas son fitohormonas que promueven la división y la diferenciación celular. Ejemplos de citocininas incluyen, sin limitar a, la cis- y trans-zeatina, la isopenteniladenina, la dihidrozeatina (con sus respectivos derivados glicosilados), la benciladenina, la kinetina y la topolina. También se consideran citoquininas otros compuestos de origen no vegetal y derivados sintéticos de la difenilurea como el CPPU y el tidiazuron (TDZ), que actúan como análogos estructurales de la molécula natural.

15

20 Como entiende el experto en la materia, en la composición de la invención también pueden ir macro y microelementos que proporcionen nutrientes a las plantas. Así, en una realización particular, la composición de la invención comprende, además, macroelementos y/o microelementos.

20

25 Los macroelementos son aquellos elementos que se expresan como % en la planta o g/100g. Los principales son nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. Los microelementos se expresan como ppm (parte por millón) = mg/Kg = mg /1000g, y los principales son hierro, cinc, cobre, manganeso, molibdeno, boro y cloro. Se sabe que existen unos 27 elementos químicos que tienen funciones en la planta que, debido a que la planta los requiere a unas concentraciones determinadas, hay que añadirlas al

30 suelo. Existen además otros nutrientes benéficos como por ejemplo el silicio, el sodio y el cobalto que fortalecen algunas características de las plantas en diferentes especies. El experto en la materia sabe cuáles son los macro- y micronutrientes adecuados a añadir a la planta de interés para cubrir las necesidades de la misma.

30

35

Así, en una realización particular, los macroelementos de la composición de la invención se seleccionan del grupo que consiste en sales de nitrógeno, sales de fósforo, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio, sales de azufre y combinación de ellos.

5

En otra realización particular, los microelementos de la composición de la invención se seleccionan del grupo que consiste en sales de hierro, sales de zinc, sales de cobre, sales de manganeso, sales de molibdeno, sales de boro, sales de cloro y combinaciones de ellos.

10

La composición de la invención puede comprender adicionalmente la semilla de una planta cuyo crecimiento se quiere promover. De esta forma, la semilla se encuentra en contacto con la cepa de la invención (y con otros componentes que puedan incluirse en la composición de la invención) lo que permite un mejor desarrollo de la semilla y de la planta derivada de ella y finalmente, la obtención de una planta con características óptimas. La semilla puede pertenecer a cualquier planta, tanto plantas de cultivo, como ornamentales y forrajeras. Preferiblemente, la semilla pertenece a una planta no leguminosa, más preferiblemente, a una planta de zanahoria, una planta de brócoli o una planta de maíz.

20

La cepa o la composición de la invención puede encontrarse en cualquier forma de presentación adecuada para su administración o aplicación al suelo que rodea la planta, a la propia planta o a la semilla. De esta forma, puede encontrarse por ejemplo, aunque sin limitarse a, en forma sólida o líquida. Las formas de presentación líquidas son adecuadas para su pulverización sobre el suelo, la planta o el material vegetal, o bien para crear una solución en la que se sumergen las plantas o el material vegetal. Alternativamente las composiciones se pueden encontrar en forma sólida mediante liofilización y posterior peletización de las mismas, las cuales pueden ser aplicadas directamente al suelo o resuspendidas en soluciones, preferentemente acuosas.

30

#### Usos de la composición de la invención

La presente invención se refiere a una cepa de *Rhizobium leucaenae* CECT8306 que, cuando se administra a una planta, tiene la capacidad de interactuar con ella y

35

promover su crecimiento, consiguiendo incrementar tanto el desarrollo foliar como radicular de la misma.

5 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una cepa de *Rhizobium leucaenae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT 8306, o la composición que la comprende, como biofertilizante.

10 En la presente invención se entiende por “biofertilizante” a la composición que está destinada a abastecer y suministrar a la planta los componentes necesarios para su crecimiento y desarrollo, estando entre dichos componentes microorganismos (o sustancias producidas por los mismos) que proporcionan o mejoran la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a la planta favoreciendo el desarrollo y crecimiento de la misma. En la presente invención, los microorganismos de la composición  
15 comprenden, al menos, un microorganismo de la cepa *Rhizobium leucaenae* CECT 8306.

Los biofertilizantes pueden presentarse en forma líquida o en forma sólida, dependiendo de la forma de administración que vaya a emplearse. Pueden aplicarse  
20 directamente al suelo antes o después de la siembra del cultivo, mediante aspersión o en el surco de la siembra o sobre toda la superficie. Otra posibilidad es aplicar el biofertilizante a la semilla antes de ser sembrada. Las dosis y épocas de aplicación del biofertilizante durante el ciclo del cultivo dependerán de la concentración de microorganismos y/o del tipo de cultivo. Técnicas sobre cómo administrar  
25 biofertilizantes y la cantidad a administrar son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y su uso es práctica de rutina para el experto en la materia. Preferiblemente, en una realización particular, la concentración de la cepa de la invención es de  $1 \times 10^8$  UFC/mL y  $3,8 \times 10^8$  UFC/mL, en particular, entre  $1,8 \times 10^8$  UFC/mL y  $3,6 \times 10^8$  UFC/mL, más particular, entre  $2 \times 10^8$  UFC/mL y  $3 \times 10^8$  UFC/mL, aún más particular,  
30  $2,5 \times 10^8$  UFC/mL. En vehículos o medios sólidos la concentración de la cepa de la invención es de entre  $1,8 \times 10^8$  UFC/g y  $3,6 \times 10^{11}$  UFC/g.

En la presente invención, se analiza la capacidad biofertilizante analizando la diferencia en el peso seco de las plantas tratadas con respecto a las plantas control,  
35 suponiendo un mayor peso seco un mayor desarrollo como resultado de un mayor número de estructuras o un mayor desarrollo de las mismas. Otros métodos

conocidos en el estado de la técnica podrían ser utilizados para determinar la capacidad fertilizante como por ejemplo, la determinación de la biomasa o la medición de la altura de las plantas respecto a los controles.

5 En base a la capacidad de la cepa de la invención de incrementar y/o promover el crecimiento de las plantas, en otro aspecto la invención se relaciona con el uso de una cepa de *Rhizobium leucaenae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT 8306, o la composición que la comprende, para incrementar o promover el crecimiento de las plantas.

10

Tal como se ha explicado en párrafos anteriores, se entiende que una cepa (o cepa o compuesto derivado de ella) tiene la capacidad de “incrementar” o “promover” el crecimiento vegetal cuando dicha cepa es capaz de aumentar la cantidad de biomasa producida por una planta en unidad de tiempo.

15

La cepa de la invención o composición que la comprende puede aplicarse a cualquier planta cuyo crecimiento se quiere incrementar, principalmente, plantas con algún interés comercial, optimizando así su producción y rendimiento. En una realización particular, las plantas se seleccionan entre plantas de cultivo y plantas ornamentales.

20

Ejemplos de plantas de cultivo incluyen, sin limitar a, cereales (tales como arroz, maíz, trigo, escanda, cebada, avena, quinua, trigo, centeno, espelta, etc.), hortalizas (tales como zanahoria, acelga, espinaca, remolacha, apio, apio nabo, chirivía, perejil, berenjena, patata, pimiento, tomate, ajo, ascalonia, cebolla, espárrago, puerro, acelga, borraja, endibia, escarola, hierba de los canónigos, lechuga, champiñón, guisante, haba, judía verde, calabacín, calabaza, pepino, alcachofa, boniato, brócoli, col blanca, col china, col de Bruselas, col de Milán, col lombarda, coliflor, colinabo, colirábano, nabo, rábano, etc.), plantas de tabaco y plantas de girasol. Otro tipo de plantas cuyo crecimiento puede incrementarse son los árboles frutales, tales como naranjos, manzanos, perales, etc., o frutales de baya, tales como fresas, frambuesas, arándanos, grosellas, etc. Ejemplos de plantas ornamentales incluyen, sin limitar a, claveles, rosas, tulipanes, flores de pascua y geranios.

30

35

En una realización particular, las plantas de cultivo son plantas no leguminosas. En la presente invención, se entiende por “planta no leguminosa” a todas aquellas plantas que no pertenecen a la familia *Fabaceae* o *Leguminosae* dentro del orden *Fabales*.

Dentro de las plantas no leguminosas, una de las que presentan mayor interés agronómico es la familia de las solanáceas, dentro de las cuales se encuentra el tomate y el pimiento. No obstante, en otra realización más particular, la planta no leguminosa se selecciona del grupo que consiste en una planta de zanahoria, una planta de brócoli y una planta de maíz.

Método para incrementar o promover el crecimiento de las plantas

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para incrementar o promover el crecimiento de una planta, de aquí en adelante “método de la invención” que comprende:

- (a) poner en contacto una planta o la semilla de dicha planta con la cepa o con la composición de la invención, y
- (b) desarrollar la semilla o la planta de la etapa (a).

La expresión “incrementar o promover” el crecimiento de una planta ha sido definida previamente en la presente descripción. Igualmente, plantas sobre las que se puede aplicar el método de la invención también han sido mencionadas anteriormente. Así, en una realización particular, las plantas se seleccionan entre plantas de cultivo y plantas ornamentales, que en otra realización más particular, son plantas de cultivo no leguminosas, que en otra realización todavía más particular, la planta de cultivo no leguminosa se selecciona del grupo que consiste en una planta de zanahoria, una planta de brócoli y una planta de maíz.

En una primera etapa, el método de la invención comprende poner en contacto una planta o la semilla procedente de dicha planta con la cepa o la composición de la invención. La planta o la semilla de la misma puede ponerse en contacto con la cepa o la composición de la invención por cualquier técnica conocida, como por ejemplo, pero sin limitarse a, a través de hidroponía, a través de una solución aplicada al suelo, por medio de la aplicación de la cepa o composición por pulverización, rociado, revestimiento, fumigación o impregnación de cualquier parte aérea de la planta o de la semilla, mediante la introducción de la cepa o la composición de la invención en el agua de riego, mediante la germinación de semillas de la planta en presencia de dicha cepa o composición, mediante cultivo de material vegetal *in vitro* en contacto con la cepa o composición de la invención, o mediante inmersión de la raíz de la planta en una solución que comprende la cepa o la composición de la invención.

Así, en una realización particular, la puesta en contacto entre la planta o la semilla procedente de la misma y la cepa o la composición de la invención, se lleva a cabo mediante el agua de riego, pulverización, rociado, revestimiento, fumigación, inmersión o impregnación.

En una segunda etapa, el método de la invención comprende desarrollar la semilla o la planta de la etapa (a). Dicho desarrollo comprende proporcionar a la planta o la semilla las condiciones adecuadas de luz, temperatura, humedad, nutrientes, etc. para que la planta crezca o para que la semilla germine y de lugar a una planta. Las condiciones adecuadas de crecimiento para las distintas plantas de cultivo pueden encontrarse en manuales ampliamente conocidos por el experto en la materia y disponibles al público.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una semilla que comprende la cepa de la invención, de aquí en adelante "semilla de la invención". La semilla puede proceder de cualquier planta de las mencionadas anteriormente. Como entiende en el experto en la materia a la vista de la presente invención, la planta procedente de la semilla de la invención mostrará un mayor crecimiento y desarrollo que plantas que proceden de semillas que no han estado en contacto y que no comprende la cepa de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### 30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **Figura 1** es una imagen de fluorescencia que muestra un biopelícula formado en el portaobjetos después de haberlo teñido y visto a través de iluminación con ultravioleta.

35 La **Figura 2** una imagen obtenida mediante microscopía de fluorescencia que muestra la cepa *R. leucaenae* CECT8306 colonizando la superficie de la raíz de *Zea mays*. En

gris claro (puntitos) se observan las células de *R. leucaenae* CECT8306 y en gris oscuro las células vegetales teñidas con una solución de yoduro de propidio (5 mM).

5 La **Figura 3** es una imagen obtenida mediante microscopía de fluorescencia que muestra la cepa *R. leucaenae* CECT8306 colonizando la superficie de la raíz de *Daucus carota*. En gris claro (puntitos) se observan las células de *R. leucaenae* CECT8306 y en gris oscuro las células vegetales teñidas con una solución de yoduro de propidio (5 mM).

10 La **Figura 4** es una imagen obtenida mediante microscopía de fluorescencia que muestra la cepa *R. leucaenae* CECT8306 colonizando la superficie de la raíz de brócoli (*Brassica oleracea italica*). En gris claro (puntitos) se observan las células *R. leucaenae* CECT8306 y en gris oscuro las células vegetales teñidas con una solución de yoduro de propidio (5 mM).

15 La **Figura 5** es una fotografía de las plantas de maíz cultivadas en invernadero a los 15 días de su siembra. A la derecha se encuentra la planta de maíz control sin inocular y a la izquierda la planta de maíz inoculada con *R. leucaenae* CECT8306 donde se observa claramente la diferencia de altura en los primeros estadios de crecimiento.

20 La **Figura 6** es una fotografía de las plantas de maíz cultivadas en invernadero a los 40 días de su siembra. A la derecha se encuentra la planta de maíz control sin inocular y a la izquierda la planta de maíz inoculada con *R. leucaenae* CECT8306 donde se observa claramente la diferencia de altura en los primeros estadios de crecimiento.

30 La **Figura 7** es una fotografía de las plantas de maíz cultivadas en invernadero a los 70 días de su siembra. A la derecha se muestra una planta de maíz control sin inocular y a la izquierda una planta de maíz inoculada con *R. leucaenae* CECT8306 donde se observa claramente la diferencia de altura entre ambas.

35 La **Figura 8** es una fotografía de las plantas de maíz cultivadas en invernadero. A la izquierda se muestra una planta de maíz control sin inocular y a la derecha una planta de maíz inoculada con *R. leucaenae* CECT8306 donde se observa la diferencia en la superficie radicular.

La **Figura 9** es una fotografía de las plantas de zanahoria en invernadero. A la izquierda se muestra una planta control sin inocular y a la derecha una planta inoculada con *R. leucaenae* CECT8306.

5

La **Figura 10** es una fotografía de las plantas de brócoli en invernadero. A la izquierda se muestra una planta control sin inocular y a la derecha una planta inoculada con *R. leucaenae* CECT8306.

## 10 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

15

### Ejemplo 1

#### **Aislamiento de la cepa *Rhizobium leucaenae* CECT8306 (cepa CRMZ151) y su uso como promotora del crecimiento vegetativo de las plantas**

#### I - MATERIALES Y MÉTODOS

20

##### *Aislamiento de la Cepa*

La cepa objeto de estudio fue aislada a partir del interior de raíz de *Zea mays*. Para asilar a los microorganismos endófitos se esterilizó la raíz en superficie. Para ello, la raíz se lavó con agua estéril para eliminar los restos de suelo que pudieran quedar. A continuación, se cortaron pequeños trozos de raíces de unos 5 mm de longitud, que se trataron en tubos con etanol al 70% durante dos minutos, posteriormente se introdujeron en una solución de lejía comercial al 20% (1% de cloro activo) durante 5 minutos y por último de nuevo en etanol al 70% durante 1 minuto. Después, y manteniendo las condiciones asépticas, se realizaron cuatro lavados con agua estéril para eliminar los restos de etanol y lejía. Acto seguido, se trituraron las raíces con ayuda de una varilla de cristal estéril, con la cual se sembró el triturado en placas Petri con medio de cultivo YMA (Vincent, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific) modificado (10 gL<sup>-1</sup> manitol, 1 gL<sup>-1</sup> extracto de levadura, 0,2 gL<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 gL<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 gL<sup>-1</sup> NaCl, 20 gL<sup>-1</sup> agar). Las placas se cultivaron a 28°C durante 4 días.

35

El aislado objeto de estudio fue nombrado cómo cepa CRMZ151 (*R. leucaenae* CECT8306). El gen 16S rRNA de la cepa CRMZ151 fue analizado tal y cómo se describe en Rivas *et al.*, 2007. La secuencia obtenida se identificó comparándola con las cepas tipo utilizando el programa Eztaxon 2.0 (Chun *et al.*, 2007. Int J Syst Evol Microbiol 57: 2259-2261).

#### *Ensayos empleados para caracterizar la cepa CRMZ151*

La capacidad de las cepas para solubilizar fosfato *in vitro* se realizó en YED-P (Peix *et al.*, 2003. Int J Syst Evol Microbiol 53: 2067-2072). tras ser incubadas a 28°C durante 7 días. La producción de sideróforos se evaluó en el medio M9-CAS-AGAR (Schwyn y Neilands, 1987. Anal Biochem 160: 47-56) modificado con la HDTMA, un disolvente catiónico que estabiliza el complejo Fe-CAS, dándole un color característico (Alexander y Zuberer, 1991. Biol Fertil Soils 12: 39-45). La producción de ácido indol acético se llevó a cabo en el medio JMM (O'hara *et al.*, 1989. Appl Environ microbiol 55, 1870-1876) suplementado con 0,17g/L de triptófano. Tras 7 días, se recuperaron los sobrenadantes mediante centrifugación y filtración utilizando filtro Millipore de 0,22 µm (Millipore Co., Amicon, USA). A continuación, se añadió 1mL de agente Salkowsky por cada 2 mL de sobrenadante. La solución resultante se midió mediante espectrofotometría a un longitud de onda de 550nm utilizando un espectrofotómetro ATI Unicam 8625 (Mattson, USA) (Khalid *et al.*, 2004. J Appl Microbiol 96: 473-480). El marcaje de la cepa CRMZ151 se realizó utilizando un conjugación biparental, empleando la cepa de *Escherichia coli* S17.1 transformada con el plásmido pHC60 (Cheng and Walter, 1998. J Bacteriol 180: 5183-5191). A partir de cultivos frescos de las cepas receptora y donadora, las cepas se mezclaron sobre placas de YMA y fueron incubadas 24 horas a 28°C. Los conjugantes fueron seleccionados en Medio mínimo (O'Gara y Shanmugan, 1976. Biochim Biophys Acta 451: 342-352) suplementado con tetraciclina a una concentración de 10µg/mL. Una vez obtenido el cultivo puro de la cepa CRMZ151 transformada con el plásmido pHC60 se cultivaron en medio YMA suplementado con tetraciclina (10 µg/mL).

30

Para el estudio de la colonización de las plantas se utilizaron semillas de maíz, zanahoria y brócoli esterilizadas superficialmente introduciéndolas 30 segundos en etanol al 70% y en hipoclorito de sodio durante 5 minutos, en el caso del maíz 20 minutos. Tras realizar 5 lavados con agua estéril, se colocaron en placas con agar agua sobre un papel de filtro. Las semillas se inocularon con la cepa CRMZ151

35

silvestre y se observaron las diferencias que aparecían entre aquellas inoculadas y aquellas que no habían sido inoculadas.

5 Del mismo modo, se inocularon plántulas de maíz, brócoli y zanahoria con la cepa transformada con el plásmido pHc60 y fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio NIKON eclipse 80i a diferentes tiempos.

10 La capacidad de producir celulosa se evaluó utilizando el medio de cultivo YMA convencional con 25 mg/L de Rojo Congo. El Rojo Congo es un compuesto capaz de unirse a polímeros de 1,4-β glucosa y es comúnmente utilizado para la detección de celulosa. Sobre la superficie del medio se añadieron 5μl de suspensión bacteriana, incubando las placas durante 3 días a 28°C.

15 Por otra parte, se realizaron ensayos relacionados con la formación de biopelículas que se llevaron a cabo según (Fujishige, N.A. *et al.* 2006. FEMS Microbiol Ecol 56: 195-206) con algunas modificaciones. Se preparó un pre- inóculo incubando la cepa CRZM151 a 28°C con agitación orbital a 180 rpm, durante 2-3 días, hasta alcanzar la fase de latencia (densidad óptica a 600 nm, alrededor de 2,0). Cuando llegó a esta fase se centrifugó y se lavó con agua destilada estéril. Después se resuspendió el  
20 pellet en el mismo medio a una D.O.600 nm de 0,2 (aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/mL) y se guardó para usarlo posteriormente. Por otro lado, se introdujo un portaobjeto previamente estéril dentro de un tubo falcon de 50 mL, se agregaron 25 mL de medio de cultivo para el microorganismo, en este caso YMB ( $10 \text{ gL}^{-1}$  manitol,  $1 \text{ gL}^{-1}$  extracto de levadura,  $0,2 \text{ gL}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,2 \text{ gL}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,5 \text{ gL}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $20 \text{ gL}^{-1}$ )  
25 y se inoculó con 10 μL de bacterias. A continuación se dejó incubando a 150 rpm a 28 °C durante 3 días. La formación del biopelícula se observó al microscopio. Para ello, se sacó el portaobjetos cuidadosamente del tubo falcon y se sumergió en una solución de blanco de calcoflúor. A continuación, en una solución de KOH al 10%, se miró en qué cara del portaobjetos se había adherido mejor la bacteria, eligiendo ésta  
30 para verla al microscopio de fluorescencia y la otra cara se limpió bien evitando que queden restos del colorante. Por último, se colocaron plantas de todas las especies sobre sustrato y fueron inoculadas con la cepa CRMZ151 para determinar si era capaz de promover el crecimiento vegetal en condiciones de microcosmos.

35

## II - RESULTADOS

La cepa CRMZ151 fue aislada a partir del interior de raíz de *Zea mays* cultivada en suelo procedente de la localidad de Ciudad Rodrigo, situada en el suroeste de la provincia de Salamanca.

5 La secuencia obtenida del gen 16S rRNA de la cepa CRMZ151 fue analizada y comparada en GenBank utilizando los programas BLASTN (Alschul *et al.*, 1990. J Mol Biol 215: 403-410) y EzTaxon (Chun *et al.*, 2007. Int J Syst Evol microbiol 57: 2259-2261). La secuencia fue alineada utilizando el software Clustal\_X (Thompson *et al.*, 1997. Nucleic Acid Res 25: 4876-4882). La comparación de la secuencia del gen 16S  
10 rRNA de la cepa CRMZ151 en la base de datos EzTaxon mostró que nuestro aislado presentaba una similitud del 100% con respecto a la cepa tipo de *Rhizobium leucanae*. Es la primera vez que se encuentra esta especie en suelos españoles y como endófito de maíz. La cepa CRMZ151 fue depositada en la Sociedad Española de Cultivos tipo con el número de registro CECT8306.

15

La cepa CRMZ151 mostró que era capaz de producir sideróforos, solubilizar fosfato en forma de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y producir 0,362 g/L de ácido indol-acético cuando estos mecanismos de promoción del crecimiento son probados *in vitro*.

20 La primera etapa en el estudio de la interacción planta-microorganismo fue la inoculación de semillas de *Zea mays*, *Daucus carota* y *Brassica oleracea italica*. En este ensayo se observó que las semillas de *Zea mays* inoculadas con la cepa a estudio presentaban un crecimiento superior al del control negativo y un mayor grosor de la raíz secundaria, por lo que le proporcionaría mayor anclaje y fijación de la planta  
25 al suelo, además del soporte, al tener mayor superficie también se absorbe más agua y los nutrientes minerales disueltos en ella, provocando un mayor crecimiento. Del mismo modo, está relacionado con una mayor capacidad para soportar las fluctuaciones ambientales pues la raíz llega a capas más profundas del suelo y es menos sensible a las situaciones de estrés hídrico o nutricional. Las semillas *Zea*  
30 *mays* inoculadas, también presentaban raíces con un aspecto más piloso, relacionado seguramente con la producción de ácido indolacético que estimula el desarrollo de los mismos. Este carácter juega a favor de las semillas inoculadas ya que la superficie de absorción de la planta se ve incrementada. Las plantas de *Daucus carota* inoculadas mostraban un desarrollo más temprano de la raíz que aquellas que no habían sido  
35 inoculadas y un mayor alargamiento del tallo que en el control negativo, esto supone un beneficio ya que si la raíz es más larga, habrá un mayor soporte para que se

5 produzcan las asociaciones simbióticas con los microorganismos. Además un tallo mayor implica que la competencia por el factor luz se decantaría hacia aquellas plantas inoculas. Por último, las semillas de brócoli (*Brassica oleracea itálica*) inoculadas muestran un desarrollo más temprano de la raíz, lo que le proporciona un mayor soporte así como un inicio más temprano del desarrollo, y más superficie para que absorba nutrientes, además de conferirle mayor resistencia al estrés. Estos resultados tienen una estrecha relación con la producción de ácido indol acético, ya que se ha descrito que la inoculación de semillas y plántulas con bacterias productoras de ácido indol acético está relacionada con un incremento del desarrollo
 10 en los primeros estadios y mayor número de pelos radicales.

15 Para poder comparar la producción de celulosa de la cepa CRZM151, se utilizaron cepas de controles (negativo y positivo) que ya estaban estandarizadas en el laboratorio. Una vez finalizado el experimento, se observó que la cepa era capaz de producir gran cantidad de celulosa. La producción de celulosa por parte de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal puede ser un factor esencial en la formulación de bioinoculantes, ya que estos endófitos son capaces de adherirse a las plantas por medio de la producción de celulosa, formando posteriormente biopelículas que contribuyen al crecimiento, desarrollo y defensa de la planta.

20 Cuando se analizó si la cepa era capaz de formar *in vitro* estructuras de tipo biopelícula, se observó que la cepa CRZM151 era capaz de formar este tipo de biopelículas (Figura 1). Es muy importante, por lo tanto, una buena colonización por parte de las bacterias, ya que su formación en estructuras tridimensionales, como son
 25 los biopelículas, protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y posibilita la transferencia de material genético. Además de un aumento en la resistencia, la presencia de una matriz extracelular protege a las células constituyentes de las
 30 agresiones externas y actúa como una barrera frente a la difusión de pequeñas moléculas. De esta manera queda patente que la formación de biopelículas es una estrategia adaptativa de los microorganismos, que les permite establecer interacciones positivas y beneficiosas con la planta que colonizan.

35 El marcaje con el plásmido pHc60 permitió realizar estudios de microscopia de fluorescencia. En un primer lugar, se llevo a cabo el estudio de la interacción entre

CRMZ151 y las plántulas de *Zea mays*. La colonización observada fue óptima, creciendo la bacteria principalmente en la parte superior de la raíz pero extendiéndose con el tiempo por toda la superficie radicular (Figura 2). En esta planta se observó un patrón de colonización intercelular, donde la bacteria colonizó los espacios intercelulares formando un mosaico sobre la superficie de la raíz. Cuando se estudió la colonización en las partes más antiguas de la raíz, es decir, aquellas más cercanas a la semilla, se observaron gran cantidad de bacterias creciendo entre los pelos radicales de la raíz, tapizando la superficie radicular y formando estructuras tridimensionales adheridas a los pelos radicales donde las polímeros extracelulares secretados por la bacteria formaban grandes agregados similares a biopelículas. Con referencia a este hecho, ya se ha mencionado que CRMZ151 fue capaz de producir celulosa *in vitro*, por lo que ambos resultados deben estar relacionados ya que la celulosa es uno de los componentes principales del exopolisacárido de *Rhizobium*, involucrado directamente en la formación de biopelículas. En el caso del maíz, se observó que la colonización era altamente dirigida y localizada principalmente a las zonas superiores donde es capaz de reproducirse, pero además las zonas de crecimiento también son colonizadas aunque de manera mucho más difusa, restringiéndose únicamente a los espacios intercelulares.

Las plántulas de *Daucus carota* inoculadas con la cepa CRMZ151 marcada con el plásmido pHc60 fueron observadas al microscopio de fluorescencia mostrando una buena colonización. Al estudiar las raíces de esta planta se vio una colonización continua y ligeramente dispersa por la superficie de la raíz, mostrando una destacada predilección por las zonas superiores y disminuyendo hasta la zona de elongación de la raíz (Figura 3). Se vio una relación directa entre las zonas donde abundaban los pelos radicales y la colonización por parte de la cepa CRMZ151, de tal manera que las zonas donde había mayor cantidad de pelo radicales se encontraban colonizadas en mayor medida y las zonas donde había menor número de pelos radicales o estos eran de un menor tamaño, el número de bacterias que colonizaban la raíz era sensiblemente menor. Un hecho curioso observado fue la adhesión de esta bacteria durante los primeros días tras la inoculación a los pelos radicales y que no se volvió a observar durante el estudio, apareciendo con el tiempo mayor cantidad de bacterias en los valles entre las células de la superficie de la raíz. La explicación más racional a este hecho es que durante la formación de los pelos radicales hay importantes cambios en la pared celular de las plantas, excretándose al medio sustancias que pudieran ser captadas por las bacterias como indicadores de lugares de penetración

hacia el interior de la planta demostrando que las bacterias endófitas tienen especial capacidad para interactuar con las plantas huésped y responder a sus estímulos.

5 La última de las plantas inoculadas fue el brócoli (*Brassica oleracea italica*). En ella, las imágenes obtenidas permitieron comprobar cómo desde los primeros días tras la inoculación había una colonización muy activa de la superficie de la raíz. La bacteria fue capaz de colonizar toda la superficie de raíz formando un tapiz homogéneo pero no excesivo (Figura 4). Con el paso del tiempo desde la inoculación, la disposición de las bacterias evolucionó mostrando una importante predilección por los valles o 10 depresiones formados entre las células de la raíz. En otros casos, se observó cómo a partir del séptimo día de inoculación la cepa CRZM151, además de mostrar una disposición característica sobre la raíz, también se disponía entorno a los lugares de emergencia de pelos radicales. Esta es una estrategia seguida por algunas especies del género *Rhizobium* a la hora de formar nódulos fijadores de nitrógeno y también por 15 muchos endófitos. De esta manera, el microorganismo aprovecha los lugares más débiles de la superficie radicular para colonizar el interior de la planta, ocupando un espacio donde poder desarrollarse e interactuar con ella. Otro de los aspectos destacables observados durante el estudio de la colonización de raíces de brócoli fue la formación de biopelículas o protobiopelículas entorno a la superficie de la raíz. 20 Estos datos reafirman los resultados obtenidos a la hora de evaluar la capacidad de formar biopelículas *in vitro*. Esta cualidad aporta un beneficio más a la planta ya que la bacteria es capaz de aumentar la superficie de contacto con el medio, incrementándose la superficie útil para la absorción de nutrientes. También hay que destacar que este polisacárido puede proteger a la planta frente a fluctuaciones 25 ambientes por su mayor capacidad para la retención de agua.

En último lugar, se analizó la capacidad de esta cepa para promover el desarrollo en plantas de *Zea mays*, *Daucus carota* y *Brassica oleracea italica*.

30 Los ensayos de microcosmos fueron llevados a cabo en un invernadero con temperatura y luz controlada para evitar situaciones de estrés para las plantas. Se seleccionó como sustrato para desarrollar el experimento una mezcla de turba y vermiculita, en proporción 3:1. Se evaluó la capacidad para promover el crecimiento en las primeras etapas del desarrollo de las plantas para tal fin se cultivaron plantas 35 de cada uno de los cultivos elegidos para inocular y otras plantas como control negativo que no serían inoculadas (Figuras 5, 6 y 7).

La primera de las plantas evaluadas fue el maíz. El maíz inoculado con CRZM151 presentó un 40% de incremento en la superficie radicular respecto al control sin  
5 inocular, lo que supone un incremento de la capacidad de la planta para absorber nutrientes y agua al incrementarse en gran medida la superficie útil de absorción de la raíz (Figura 8). El tallo central del maíz es un eje formado por nudos y entrenudos cuyo número y longitud varían notablemente en las plantas inoculadas. Los entrenudos tienen una zona activa en la que se producen nuevos tejidos, de esta manera, el tallo del maíz puede incrementar rápido en longitud durante el periodo de  
10 crecimiento, por eso es de gran importancia el mayor número de nudos, que en el presente caso fue un 30% superior en la planta inoculada. El calibre del tallo de las plantas inoculadas fue un 10% superior, lo que les proporcionó mayor porte y resistencia a la planta. Se pudo observar también que la parte aérea de las plantas inoculadas fue mucho mayor en los primeros estadios del crecimiento.

15 Las raíces de las zanahorias inoculadas con la cepa CRZM151 presentaron una longitud superior que las raíces de las zanahorias control que no habían sido inoculadas. En concreto, la longitud de las raíces de las zanahorias inoculadas fue un 15% mayor que aquellas que no habían sido inoculadas. Estas zanahorias  
20 presentaron también un incremento en el contorno de la raíz frente a las zanahorias sin inocular, cuyo diámetro promedio fue inferior (Figura 9). Además las zanahorias control poseían un porte aéreo inferior que aquellas otras zanahorias tratadas con la cepa CRZM151, en las que se observó un incremento del 10% en la longitud foliar, incrementándose la superficie fotosintética y por tanto, la capacidad para sintetizar  
25 materia orgánica. Este hecho tiene relación con el incremento de peso seco observado en las zanahorias inoculadas correspondiente a un 10% con respecto de las zanahorias control.

30 Por último en el caso del brócoli, se observó un tamaño mayor de las hojas en las plantas inoculadas, con un área foliar superior a las plantas control sin inocular. Presentaron también un desarrollo radicular superior que los controles negativos sin inocular, ya que influye de forma directa sobre una mayor capacidad para absorber nutrientes (Figura 10).

35

### III - CONCLUSIÓN

La cepa CRZM151 (*Rhizobium leucaenae* CECT8306) es una bacteria endosimbiótica de *Zea mays* capaz de promover el desarrollo foliar y radicular en plantas de *Zea mays*, *Brassica oleracea italica* y *Daucus carota*, colonizando de forma activa la rizosfera de las plantas y actuando cómo endófito promotor del crecimiento vegetal en ellas, por lo que es susceptible de utilizarse como biofertilizante en cultivos de estas plantas.

**REIVINDICACIONES**

1. Cepa de *Rhizobium leucaenae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT 8306.
- 5
2. Una cepa derivada de una cepa según la reivindicación 1, con capacidad para incrementar o promover el crecimiento de las plantas.
3. Un cultivo biológicamente puro de la cepa según la reivindicación 1 o 2.
- 10
4. Una composición que comprende una cepa de *Rhizobium leucaenae* según la reivindicación 1 o 2.
5. Composición según la reivindicación 4, en el que la concentración de la cepa de *Rhizobium leucaenae* CECT 8306 es de  $1 \times 10^8$  UFC/mL y  $3,8 \times 10^8$  UFC/mL, en particular, entre  $1,8 \times 10^8$  UFC/mL y  $3,6 \times 10^8$  UFC/mL, más particular, entre  $2 \times 10^8$  UFC/mL y  $3 \times 10^8$  UFC/mL, aún más particular,  $2,5 \times 10^8$  UFC/mL.
- 15
6. Composición según la reivindicación 4 o 5 que comprende, además, otro organismo endofítico, preferiblemente, una bacteria del género *Rhizobium* diferente de la cepa *Rhizobium leucaenae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT 8306.
- 20
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende además macroelementos y/o microelementos.
- 25
8. Composición según la reivindicación 7, en el que los macroelementos se seleccionan del grupo que consiste en sales de nitrógeno, sales de fósforo, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio, sales de azufre y combinación de ellos.
- 30
9. Composición según la reivindicación 7 u 8, en el que los microelementos se seleccionan del grupo que consiste en sales de hierro, sales de zinc, sales de cobre, sales de manganeso, sales de molibdeno, sales de boro, sales de cloro y combinaciones de ellos.
- 35

10. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 como biofertilizante.

5 11. Uso de una cepa según la reivindicación 1 o 2, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, para incrementar o promover el crecimiento de las plantas.

12. Uso según la reivindicación 11, en el que las plantas se seleccionan entre plantas de cultivo y plantas ornamentales.

10

13. Uso según la reivindicación 12, en el que las plantas de cultivo son plantas no leguminosas.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que la planta de cultivo no leguminosa se selecciona del grupo que consiste en una planta de zanahoria, una planta de brócoli y una planta de maíz.

15

15. Método para incrementar o promover el crecimiento de las plantas que comprende:

20

(a) poner en contacto una planta o la semilla de dicha planta con una cepa de *Rhizobium leucaenae* según la reivindicación 1 o 2, o con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, y

(b) desarrollar la semilla o la planta de la etapa (a).

25

16. Método según la reivindicación 15, en el que la puesta en contacto entre la planta o la semilla y la cepa de *Rhizobium leucaenae* según la reivindicación 1 ó 2, o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, se lleva a cabo mediante el agua de riego, pulverización, rociado, revestimiento, fumigación, inmersión o impregnación.

30

17. Método según la reivindicación 15 o 16, en el que las plantas se seleccionan entre plantas de cultivo y plantas ornamentales.

18. Método según la reivindicación 17, en el que las plantas de cultivo son plantas no leguminosas.

35

19. Método según la reivindicación 18, en el que la planta de cultivo no leguminosa se selecciona del grupo que consiste en una planta de zanahoria, una planta de brócoli y una planta de maíz.
- 5 20. Una semilla que comprende una cepa según la reivindicación 1 o 2.

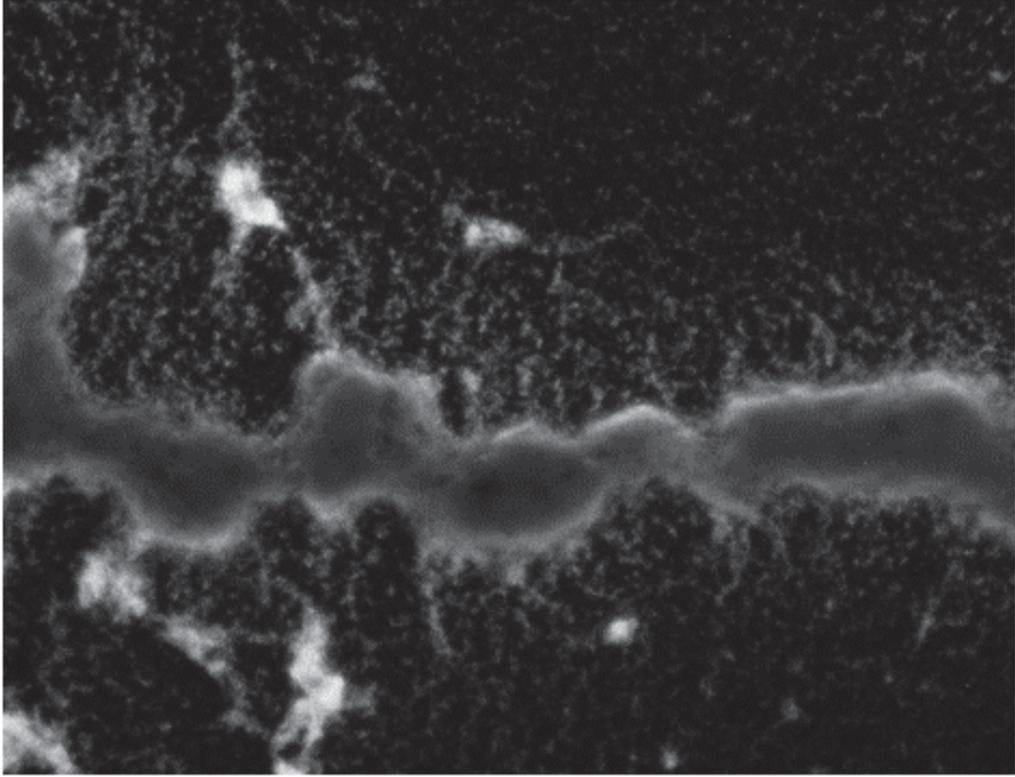


FIG. 1

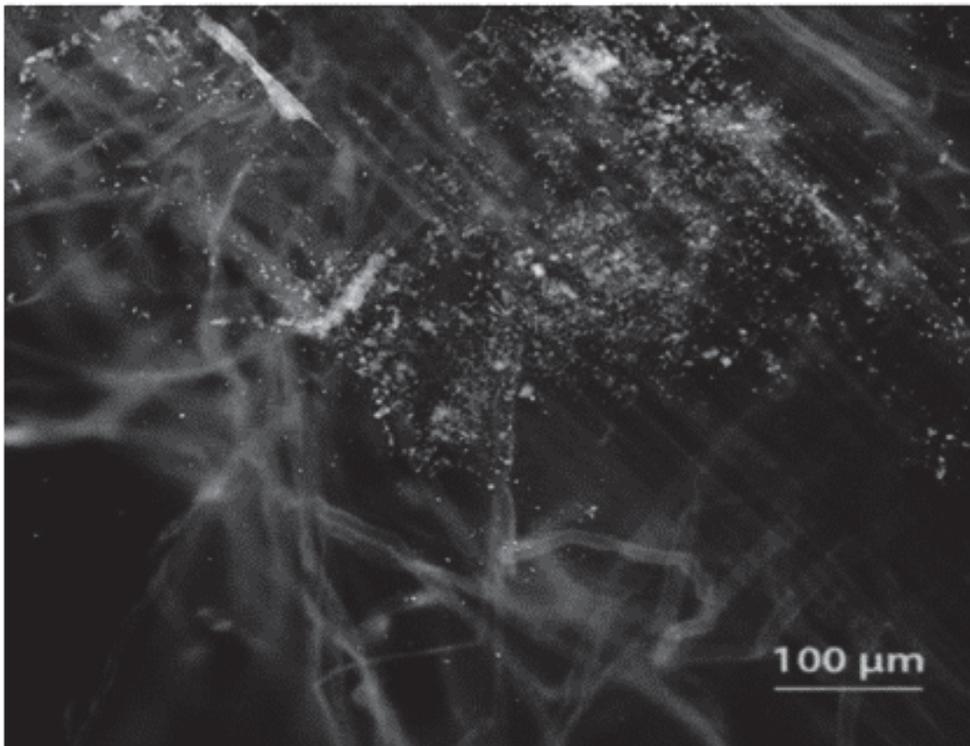


FIG. 2

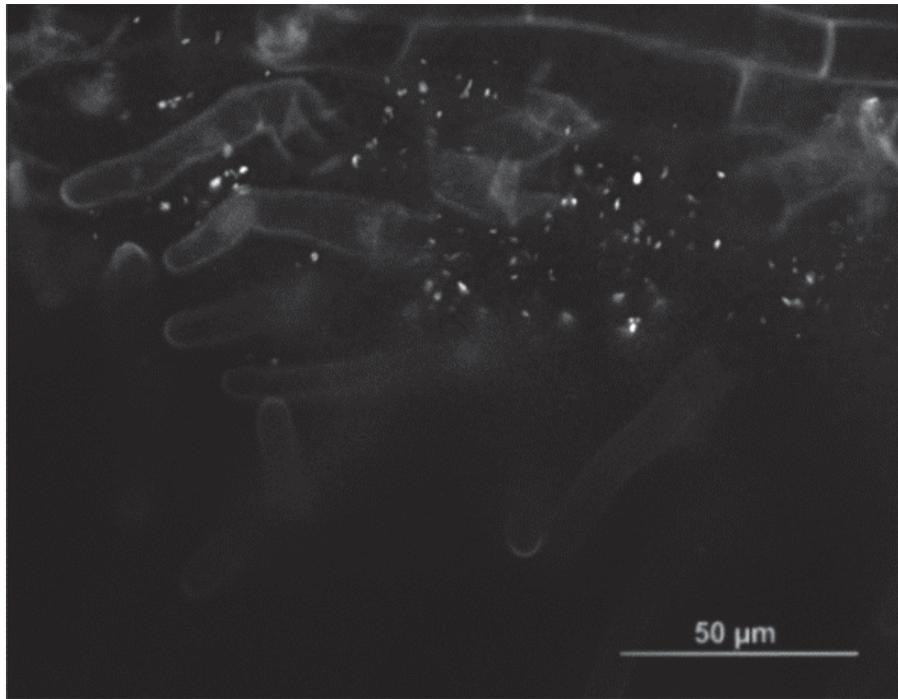


FIG. 3

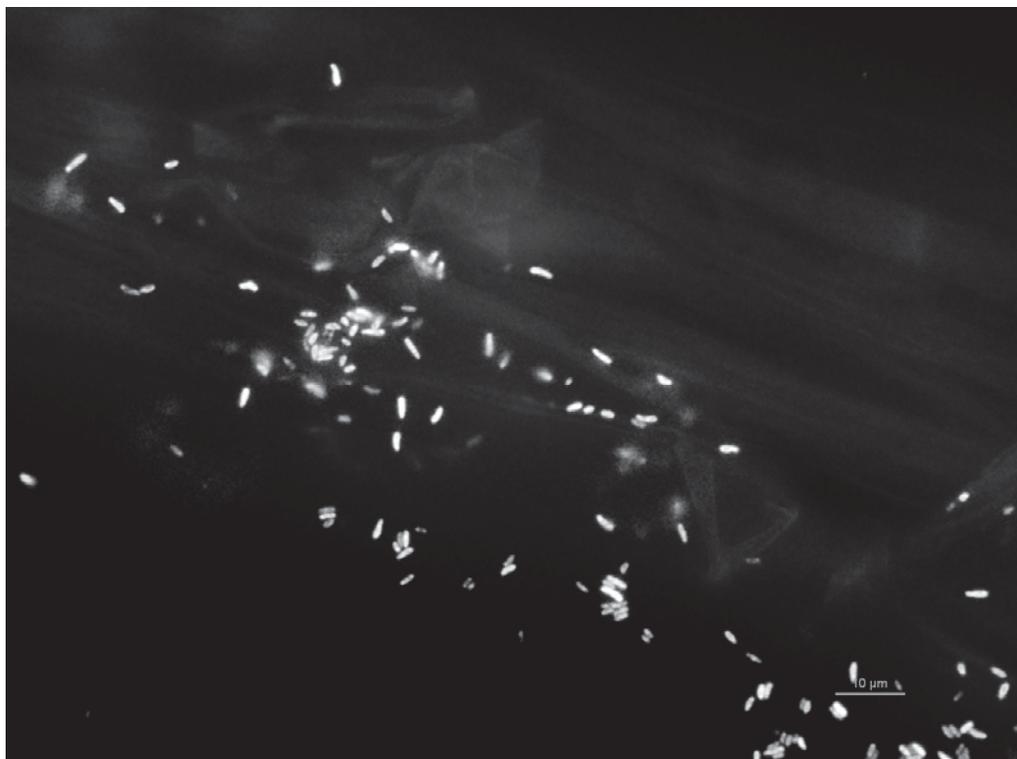


FIG. 4

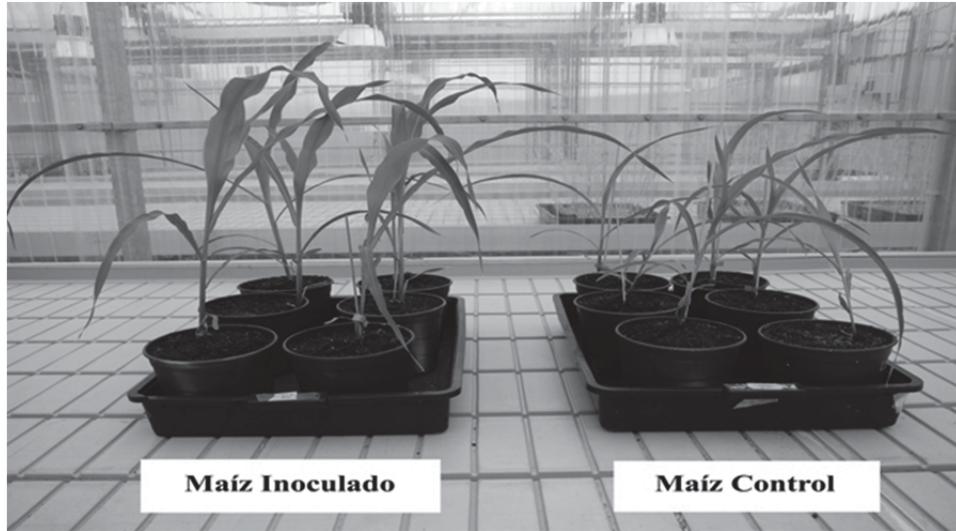


FIG. 5

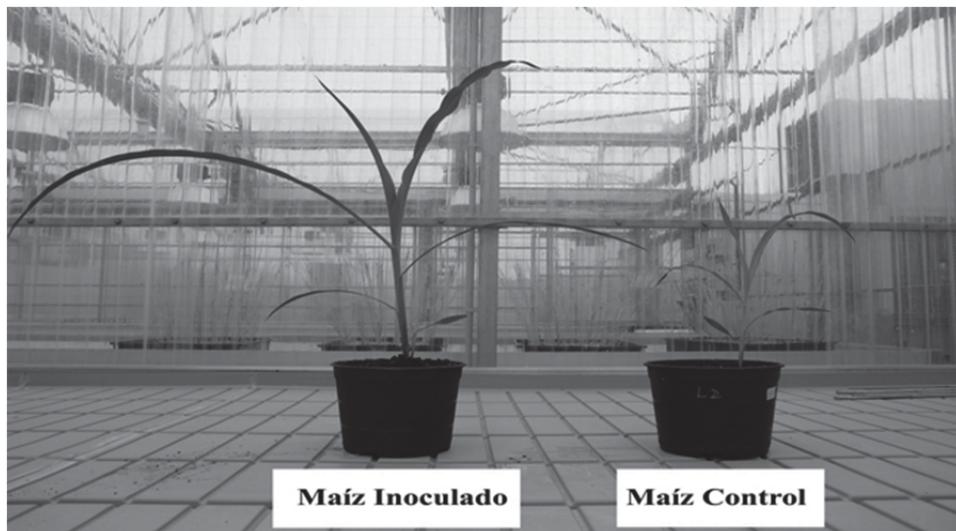


FIG. 6

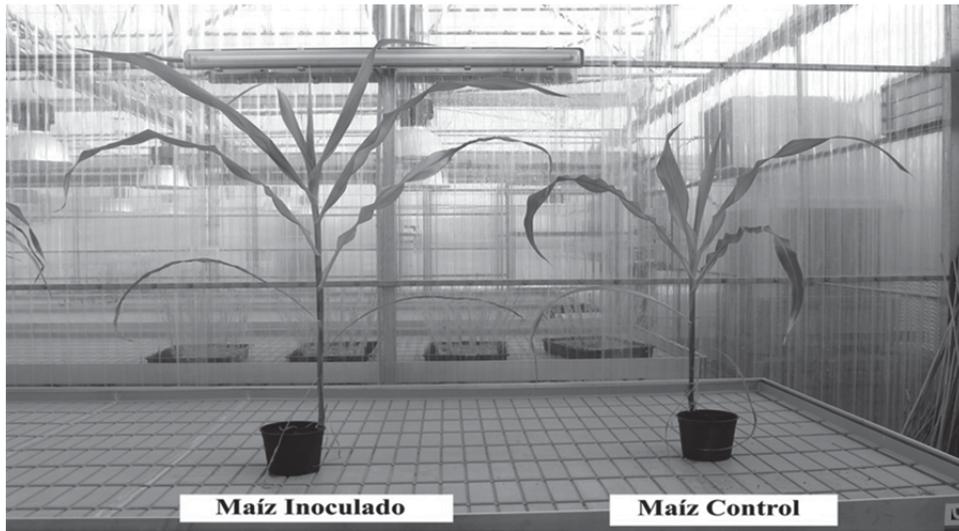


FIG. 7

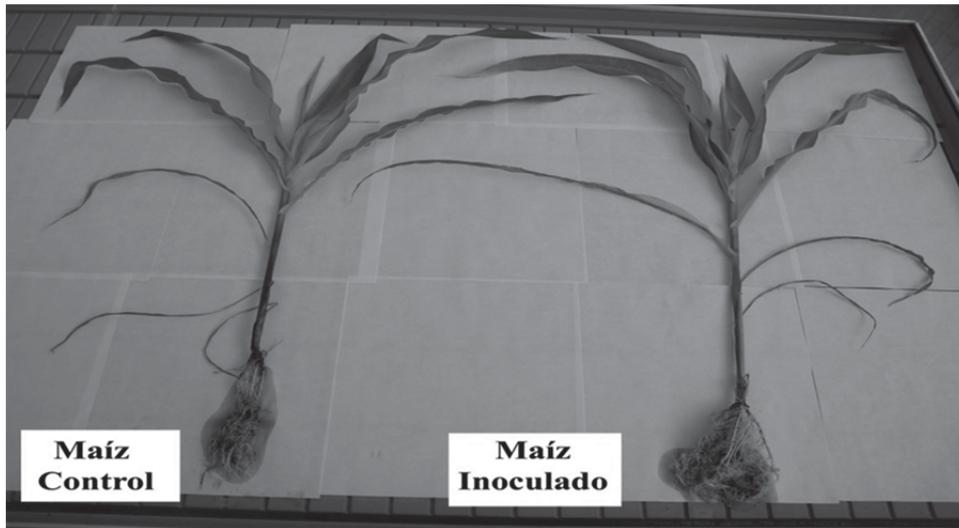


FIG. 8



FIG. 9

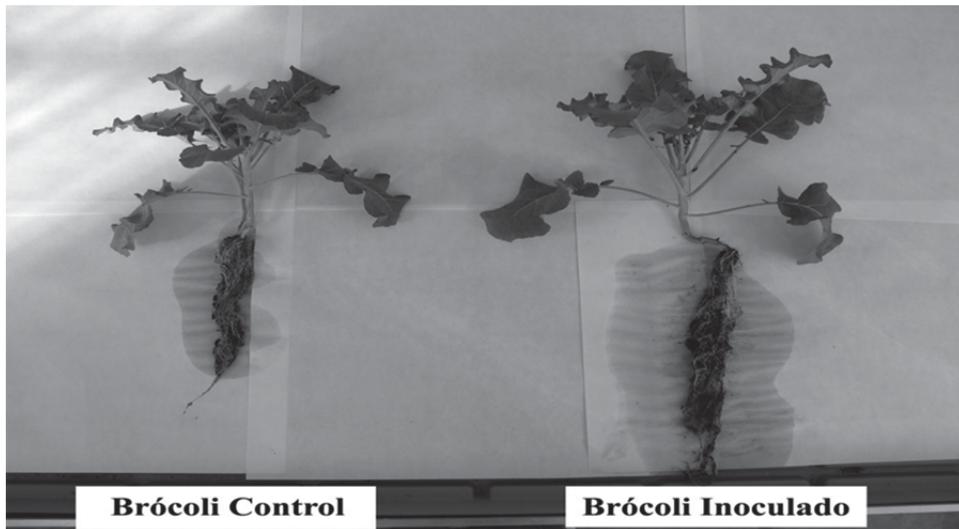


FIG. 10



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201530349

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 18.03.2015

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)  
C12R1/41 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RIBEIRO RENAN AUGUSTA et al. Reclassification of <i>Rhizobium tropici</i> type A strains as <i>Rhizobium leucaenae</i> sp nov.. <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> . 2012. VOL: 62. Págs: 1179-1184 I. Páginas 1182 y 1183.	1-20
A	JUNIER PILAR et al. Genetic diversity of <i>Rhizobium</i> present in nodules of <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cultivated in two soils of the central region in Chile. <i>APPLIED SOIL ECOLOGY</i> . 2014. VOL: 80 Págs: 60-66. Página 60.	1-20
A	DALL' et al. <i>Rhizobium freirei</i> sp nov., a symbiont of <i>Phaseolus vulgaris</i> that is very effective at fixing nitrogen. <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> . 2013. VOL: 63. Págs: 4167-4173. Página 4167.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
23.11.2015

Examinador  
I. Rueda Molíns

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.11.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-20	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-20	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RIBEIRO RENAN AUGUSTA et al. Reclassification of <i>Rhizobium tropici</i> type A strains as <i>Rhizobium leucaenae</i> sp nov.. <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> . VOL: 62. Págs: 1179-1184 I	2012
D02	JUNIER PILAR et al. Genetic diversity of <i>Rhizobium</i> present in nodules of <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cultivated in two soils of the central region in Chile. <i>APPLIED SOIL ECOLOGY</i> . VOL: 80 Págs: 60-66	2014
D03	DALL' et al. <i>Rhizobium freirei</i> sp nov., a symbiont of <i>Phaseolus vulgaris</i> that is very effective at fixing nitrogen. <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> . VOL: 63. Págs: 4167-4173	2013

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración****NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la LP11/86)**

En las reivindicaciones 1 y 2 de la solicitud de patente se reivindica una cepa de *Rhizobium leucaenae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con número de depósito CECT 8306.

En las reivindicación 3 de la solicitud de patente se reivindica un cultivo biológicamente puro de la citada cepa.

En las reivindicaciones 4-9 de la solicitud de patente se reivindica una composición que comprende la cepa objeto de la invención.

En las reivindicaciones 10-14 de la solicitud de patente se reivindica el uso de la composición como biofertilizante.

En las reivindicaciones 15-19 de la solicitud de patente se reivindica un método para incrementar o promover el crecimiento de las plantas que emplea la cepa de *Rhizobium leucaenae*.

En la reivindicación 20 de la solicitud de patente se reivindica una semilla que comprende la cepa objeto de la invención.

El documento D01 describe las características de la bacteria *Rhizobium leucaenae* sp. (ver páginas 1182 y 1183). Dicha descripción no incluye algunas de las características que presenta la cepa de la invención y que si aparecen en la descripción de la solicitud de patente.

Los documento D02 (ver página 60) y D03 (ver página 4167) reflejan la simbiosis entre *Rhizobium leucaenae* y *Phaseolus vulgaris*.

En ninguno de los documentos D01, D02 o D03 aparece una cepa de *Rhizobium leucaenae* sp que presente las mismas características que la cepa reivindicada en la solicitud de patente. Por tanto, las reivindicaciones 1-20 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.